

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年4月1日 (01.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/027055 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 9/04, 15/53, 1/21, C12P 7/04, 17/10, 41/00 // (C12N 1/21, C12R 1:19)

676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011957

(74) 代理人: 安富 康男, 外(YASUTOMI, Yasuo et al.); 〒532-0011 大阪府 大阪市 淀川区西中島 5 丁目 4 番 20号 中央ビル Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2003年9月19日 (19.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-272976 2002年9月19日 (19.09.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒530-8288 大阪府 大阪市 北区中之島 3 丁目 2 番 4 号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木崎 憲之 (KIZAKI, Noriyuki) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP). 西山 陶三 (NISHIYAMA, Tozo) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP). 八十原 良彦 (YASOHARA, Yoshihiko) [JP/JP]; 〒

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL CARBONYL REDUCTASE, GENE THEREOF AND METHOD OF USING THE SAME

(54) 発明の名称: 新規カルボニル還元酵素、その遺伝子、およびその利用法

(57) Abstract: It is intended to provide a novel polypeptide capable of efficiently producing (R)-N-benzyl-3-pyrrolidinol, a polynucleotide encoding the same and a method of using the same. Namely, a polypeptide having the following physicochemical properties (1) to (4): (1) function: acting on N-benzyl-3-pyrrolidinone to give (R)-N-benzyl-3-pyrrolidinol with the use of a coenzyme NADH or NADPH; (2) optimum function pH: 5.5 to 6.0; (3) optimum function temperature: 50°C to 55°C; and (4) molecular weight: about 55,000 in gel filtration analysis, or about 28,000 in SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Also, a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, a polynucleotide encoding this polypeptide, and a transformant producing the polypeptide at a high yield are provided.

(57) 要約: 本発明は、(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを効率よく生成する新規ポリペプチド、それをコードするポリヌクレオチドおよびその利用方法を提供する。本発明は、以下の(1)から(4)の理化学的性質を有するポリペプチドである: (1) 作用: NADHまたはNADPHを補酵素として、N-ベンジル-3-ピロリジノンに作用し、(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する、(2) 作用至適pH: 5.5から6.0、(3) 作用至適温度: 50°Cから55°C、(4) 分子量: ゲル濾過分析において約55000、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動分析において約28000。本発明は、また、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び、該ポリペプチドを高生産する形質転換体である。

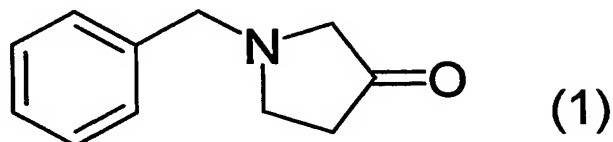
WO 2004/027055 A1

明細書

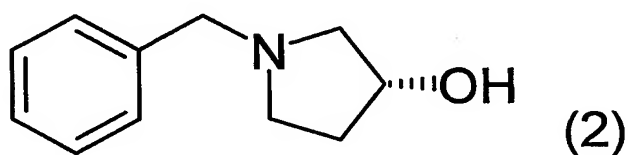
新規カルボニル還元酵素、その遺伝子、およびその利用法

技術分野

5 本発明は、式（１）



10 で表される N-ベンジル-3-ピロリジノン を立体選択的に還元して、式（２）



15 で表される（R）-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、および該発現ベクターで形質転換された形質転換体に関する。

本発明はまた、該形質転換体を用いた光学活性アルコール、とりわけ光学活性
20 N-ベンジル-3-ピロリジノール、光学活性 2-テトラロール誘導体、及び、光学活性 1-フェニルエタノール誘導体の製造法に関する。光学活性 N-ベンジル-3-ピロリジノール、光学活性 2-テトラロール誘導体、及び、光学活性 1-フェニルエタノール誘導体は、医薬、農薬等の合成原料として有用な化合物である。

25

背景技術

光学活性 N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法としては、N-ベンジル-3-ピロリジノン を立体選択的に還元する活性を有する酵素の存在下、この N-ベンジル-3-ピロリジノン を立体選択的に還元して光学活性 N-ベンジル

ー 3-ピロリジノールを製造する方法（特開平 6-141876 号公報）、N-ベンジル-3-ピロリジノンにデポダスカス（Depodascus）属等の微生物の菌体、培養物又はそれらの処理物を作用させて光学活性 N-ベンジル-3-ピロリジノールを製造する方法（特開平 10-150997 号公報）が知られている。

また、光学活性 2-テトラロール誘導体の製造方法としては、ベンゼン環上に置換基を有する 2-テトラロン誘導体にパン酵母を作用させて、対応する光学活性 2-テトラロール誘導体を製造する方法（Tetrahedron 51, 11531, (1995)）が知られている。

また、光学活性 1-フェニルエタノール誘導体の製造方法としては、2-ハロー-1-（置換フェニル）エタノンに、アシビア属やオガタエア属等に属する微生物またはその処理物を作用させ、光学活性 2-ハロー-1-（置換フェニル）エタノールを得る方法（特開平 4-218384 号公報、及び、特開平 11-215995 号公報）、1-（置換フェニル）エタノンにゲオトリカム・キャンディダム（Geotrichum candidum）の乾燥菌体を作用させ、光学活性 1-（置換フェニル）エタノールを得る方法（J. Org. Chem. 63, 8957 (1998)）が知られている。

しかしながら、これらの方法はいずれも、その基質仕込み濃度および基質から生成物への転換率が実用上十分ではなく、より効率の良い方法が待ち望まれていた。

発明の要約

本発明は、上記現状に鑑み、光学活性 N-ベンジル-3-ピロリジノール、光学活性 2-テトラロール誘導体、光学活性 1-フェニルエタノール誘導体を始めとする各種光学活性アルコールの製造に有用なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、および該発現ベクターで形質転換された形質転換体を提供することを課題とする。

また、本発明は、該形質転換体を用いて、光学活性 N-ベンジル-3-ピロリジノール、光学活性 2-テトラロール誘導体、及び、光学活性 1-フェニルエタ

ノール誘導体を始めとする各種光学活性アルコールを効率よく製造する方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、N-ベンジル-3-ピロリジノン⁵を立体選択的に還元し、(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有する微生物より、該活性を有するポリペプチドを単離した。そして、該ポリペプチドを利用することにより光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールのみならず、光学活性2-テトラロール誘導体及び光学活性1-フェニルエタノール誘導体を始めとする、有用な光学活性アルコールを効率良く製造することが可能であることを見出した。また、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを単離し、更には、発現ベクター並びに形質転換体を創製することにも成功し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して、(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成し得るポリペプチドである。

また、本発明は、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。

また、本発明は、上記ポリヌクレオチドを含有する発現ベクターである。

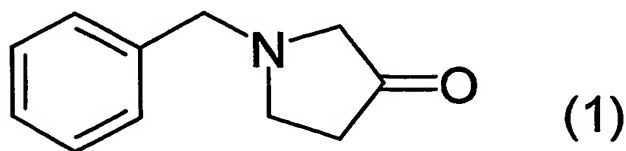
15 また、本発明は、上記ポリペプチドを高生産する形質転換体である。

更に、本発明は、該形質転換体を用いた、光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノール、光学活性2-テトラロール誘導体、及び、光学活性1-フェニルエタノール誘導体を始めとする、有用な光学活性アルコールの実用的な製造方法である。

20 発明の詳細な開示

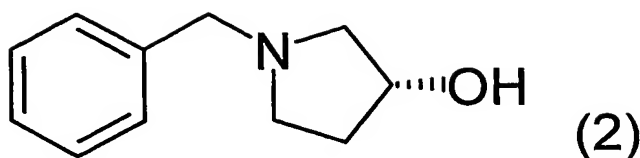
以下、詳細に本発明を説明する。本発明のポリペプチドとしては、以下の(1)から(4)の理化学的性質を有するポリペプチドが挙げられる。

(1) NADHまたはNADPHを補酵素として、下記式(1)



25 で表されるN-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して、下記式(

2)



5

で表される (R) -N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有し、

(2) 作用至適 pH が 5.5 から 6.0、

(3) 作用至適温度が 50℃ から 55℃、

(4) 分子量が、ゲル濾過分析において約 55000、SDS ポリアクリルアミ

10 ドゲル電気泳動において約 28000。

また、本発明のポリペプチドとしては、例えば、(a) 配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列からなるポリペプチド、または、(b) 配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列または配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失または付加されたアミノ酸配列を
15 含み、かつ N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して (R) -N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有するポリペプチドを挙げる
ことができる。

配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失または付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチドは、Cu
20 rrent Protocols in Molecular Biology
(John Wiley and Sons, Inc., 1989) 等に記載の公知の方法に準じて調製することができ、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して (R) -N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有する限り、本発明のポリペプチドに包含される。

25 このようなポリペプチドは、当該活性を有する微生物から単離することができる。本発明のポリペプチドの起源として用いられる微生物は、特に限定されないが、例えばデボシア (Devosia) 属細菌が挙げられ、特に好ましいものとしてはデボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina) IFO 13584 株を挙げる
ことができる。

本発明のポリペプチドを生産する微生物は、野生株または変異株のいずれであってもよく、また、細胞融合または遺伝子操作などの遺伝学的手法により誘導された微生物であってもよい。

5 遺伝子操作された、本発明のポリペプチドを生産する微生物は、例えば、これらのポリペプチドを単離および／または精製してそのアミノ酸配列の一部または全部を決定する工程、このアミノ酸配列に基づいてポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を決定する工程、およびこのポリヌクレオチドを他の微生物に導入して組換え微生物を得る工程を包含する方法により得られ得る。

10 本発明のポリペプチドを有する微生物からの該ポリペプチドの精製は、常法により行い得る。例えば、該微生物の菌体を適当な培地で培養し、培養液から遠心分離により菌体を集める。得られた菌体を例えば、超音波破砕機などで破砕し、遠心分離にて菌体残さを除き、無細胞抽出液を得る。この無細胞抽出液から、例えば、塩析（硫酸アンモニウム沈殿、リン酸ナトリウム沈殿など）、溶媒沈殿（アセトンまたはエタノールなどによる蛋白質分画沈殿法）、透析、ゲル濾過、イオン交換、逆相等のカラムクロマトグラフィー、限外濾過等の手法を単独で、また
15 または組み合わせて用いて、ポリペプチドが精製され得る。

該酵素活性は、100 mMリン酸緩衝液（pH 6.5）に、基質N-ベンジル-3-ピロリジノン5 mM、補酵素NADH 0.25 mMおよび酵素を添加し、30℃で波長340 nmの吸光度の減少を測定することにより確認および計算
20 することができる。

本発明のポリヌクレオチドとしては、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであればいずれも用いることができるが、例えば、（c）配列表の配列番号2に示した塩基配列からなるポリヌクレオチド、又は、（d）配列表の配列番号2に示した塩基配列と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドとストリン
25 ジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、前記式（1）で表されるN-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して、前記式（2）で表される（R）-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを挙げるることができる。

配列表の配列番号2に示した塩基配列と相補的な塩基配列を有するポリヌクレ

オチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドとは、配列表の配列番号 2 に示した塩基配列と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるポリヌクレオチドを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のポリヌクレオチドを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃の条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A laboratory manual, second edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 等に記載されている方法に準じて行うことができる。

ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、配列番号 2 に示されるポリヌクレオチドと、配列同一性が60%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは99%以上のポリヌクレオチドをあげることができ、コードされるポリペプチドがN-ベンジル-L-プロリンを立体選択的に還元して（R）-N-ベンジル-L-プロリンを生成する活性を有する限り、本発明のポリヌクレオチドに包含される。

ここで、「配列の同一性（%）」とは、対比される2つのポリヌクレオチドを最適に整列させ、核酸塩基（例えば、A、T、C、G、U、またはI）が両方の配列で一致した位置の数を比較塩基総数で除し、そして、この結果に100を乗じた数値で表される。

配列同一性は、例えば、以下の配列分析用ツールを用いて算出し得る：GCG Wisconsin Package (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, 1994年9月、Genetics Computer Group, 575 Sci

ence Drive Madison, Wisconsin, USA 53711; Rice, P. (1996) Program Manual for ECG Package, Peter Rice, The Sanger Centre, Hinxton Hall, Cambridge, CB10 1RQ, England)、および、the ExpASY World Wide Web分子生物学用サーバー (Geneva University Hospital and University of Geneva, Geneva, Switzerland)。

本発明のポリヌクレオチドは、N-ベンジル-3-ピロリジノン を立体選択的に還元して (R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有する微生物より取得することができる。該微生物として、例えばデボシア (Devosia) 属細菌が挙げられ、特に好ましいものとしてはデボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina) IFO13584株を挙げることができる。

以下に、N-ベンジル-3-ピロリジノン を立体選択的に還元して (R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有する微生物より、本発明のポリヌクレオチドを取得する方法の例を記載するが、本発明はこれに限定されない。

まず、精製した前記ポリペプチド、および該ポリペプチドを適当なエンドペプチダーゼで消化することにより得られるペプチド断片の部分アミノ酸配列を、エドマン法により決定する。そして、このアミノ酸配列情報をもとにヌクレオチドプライマーを合成する。次に、本発明のポリヌクレオチドの起源となる微生物より、通常のDNA単離法、例えば、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc., 1989) 等に記載の方法により、該微生物の染色体DNAを調製する。

この染色体DNAを鋳型として、先述のヌクレオチドプライマーを用いてPCR (polymerase chain reaction) を行い、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの一部を増幅する。ここで増幅されたポリ

ヌクレオチドの塩基配列は、ジデオキシ・シーケンス法、ジデオキシ・チェイン・ターミネーション法などにより決定することができる。例えば、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer社製) およびABI 373A DNA Sequencer (Perkin Elmer社製) を用いて行い得る。

該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの一部の塩基配列が明らかになれば、例えば、i-PCR法 (Nucl. Acids Res. 16, 8186 (1988)) によりその全体の塩基配列を決定することができる。また、染色体DNA上の該ポリヌクレオチドがイントロンを含むものであった場合は、例えば、以下の方法によりイントロンを含まない成熟型ポリヌクレオチドの塩基配列を決定する事ができる。

即ち、まず、該ポリヌクレオチドの起源となる微生物より、通常のヌクレオチド単離法、例えば、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc., 1989) 等に記載の方法により、該微生物のmRNAを調製する。次に、このmRNAを鋳型とし、先に判明している該ポリヌクレオチドの5'末端および3'末端付近の配列を有するヌクレオチドプライマーを用いてRT-PCR法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998 (1988)) により成熟型ポリヌクレオチドを増幅し、その塩基配列を先と同様に決定する。

本発明のポリヌクレオチドを宿主微生物内に導入し、それをその導入された宿主微生物内で発現させるために用いられるベクターとしては、適当な宿主微生物内で該ポリヌクレオチド中の遺伝子を発現できるものであればいずれもが用いられ得る。このようなベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクター等から選ばれたものが挙げられる。また、他の宿主株との間で遺伝子交換が可能なシャトルベクターであってもよい。

このようなベクターは、通常、lacUV5プロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、lppプロモーター、tufBプロモーター、recAプロモーター、pLプロモーター等の制御因子を含み、

本発明のポリヌクレオチドと作動可能に連結された発現単位を含む発現ベクターとして好適に用いられ得る。

本願明細書で用いる用語「制御因子」は、機能的プロモーターおよび、任意の関連する転写要素（例えば、エンハンサー、CCAATボックス、TATAボックス、SPI部位など）を有する塩基配列をいう。

本願明細書で用いる用語「作動可能に連結」は、該ポリヌクレオチド中の遺伝子が発現するように、ポリヌクレオチドが、その発現を調節するプロモーター、エンハンサー等の種々の調節エレメントと宿主細胞中で作動し得る状態で連結されることをいう。制御因子のタイプおよび種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを導入する宿主細胞としては、細菌、酵母、糸状菌、植物細胞、動物細胞などがあげられるが、大腸菌が特に好ましい。

本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターは、常法により宿主細胞に導入され得る。宿主細胞として大腸菌を用いる場合、例えば塩化カルシウム法により、本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを導入することができる。

本発明のポリペプチドを用いてN-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生産する場合、NADH、NADPH等の補酵素が必要となる。補酵素は通常、基質と等モルを要するが、酸化された該補酵素を還元型に変換する能力（以後、補酵素再生能と呼ぶ）を有する酵素をその基質とともに反応系に添加することにより、つまり補酵素再生系を、本発明のポリペプチドと組み合わせて反応を行うことにより、高価な補酵素の使用量を大幅に削減することができる。

補酵素再生能を有する酵素としては、例えば、ヒドロゲナーゼ、ギ酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素およびグルコース脱水素酵素などを用いることが出来る。好適には、グルコース脱水素酵素が用いられる。

上記の補酵素再生能を有する酵素を、不斉還元反応系に別途添加することによ

っても当該反応が行われ得るが、本発明のポリヌクレオチド、および補酵素再生能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの両者により形質転換せしめられた形質転換体を触媒として用いた場合、補酵素再生能を有する酵素を別に調製し反応系に添加することなしに、該反応を効率良く実施し得る。

- 5 このような形質転換体は、本発明のポリヌクレオチド、および補酵素再生能を有するポリペプチド（例えば、グルコース脱水素酵素）をコードするポリヌクレオチドを、同一のベクターに組み込み、これを宿主細胞に導入することにより得られる他、これら2種のポリヌクレオチドを不和合性グループの異なる2種のベクターにそれぞれ組み込み、それら2種のベクターを同一の宿主細胞に導入することによっても得られる。

 なお、上述したように、本発明の発現ベクターは、上記ポリヌクレオチドを含むものである。好ましくは、プラスミド pNTDR である発現ベクターが挙げられる。

- 15 本発明の発現ベクターとしては、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含むものも挙げられる。上記グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドは、バシラス・メガテリウム (Bacillus megaterium) 由来のグルコース脱水素酵素であることが好ましい。より好ましくは、プラスミド pNTDRG1 である発現ベクターが挙げられる。

- 20 本発明の形質転換体は、上記発現ベクターを用いて宿主細胞を形質転換して得られたものである。上記宿主細胞としては、大腸菌が好ましい。

 また、本発明の形質転換体として、

E. coli HB101 (pNTDR) は、FERM BP-08457 の受託番号で、平成15年8月25日付で、

- 25 E. coli HB101 (pNTDRG1) は、FERM BP-08458 の受託番号で、平成15年8月25日付で、

それぞれ、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6にある独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、ブタペスト条約に基づいて国際寄託されている。

形質転換体中の補酵素再生能を有する酵素の活性は常法により測定することができる。例えば、グルコース脱水素酵素活性の測定は、1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に、基質グルコース 0.1 M、補酵素 NADP 2 mM および酵素を添加し、25℃で波長 340 nm の吸光度の増加を測定することにより行い得る。

5 本発明の形質転換体を用いた光学活性 N-ベンジル-3-ピロリジノール、光学活性 2-テトラロール誘導体、及び、光学活性 1-フェニルエタノール誘導体等の光学活性アルコールの生産は以下のように実施され得る。つまり、形質転換体の培養物またはその処理物を、カルボニル基を有する化合物と反応させることにより、光学活性アルコールを製造する。

10 まず、適当な溶媒中に基質となるカルボニル基を有する化合物、NADH 等の補酵素、および該形質転換体の培養物またはその処理物等を添加し、pH 調整下、攪拌して反応させる。

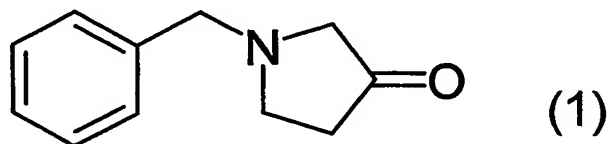
形質転換体の培養は、その微生物が増殖する限り、通常の、炭素源、窒素源、無機塩類、有機栄養素などを含む液体栄養培地を用いて行い得る。また、培養温
15 度は、好ましくは 4～50℃である。

ここで形質転換体の処理物等とは、例えば、粗抽出液、培養菌体、凍結乾燥生物体、アセトン乾燥生物体、あるいはそれらの磨砕物等を意味する。さらにそれらは、ポリペプチド自体あるいは菌体のまま公知の手段で固定化されて用いられ得る。

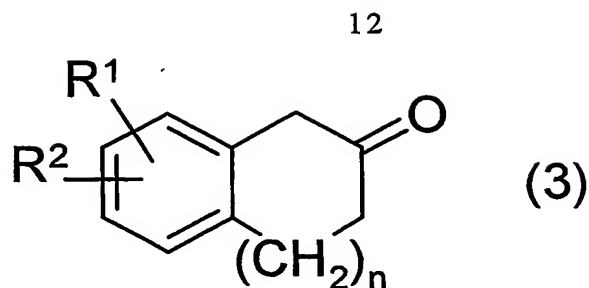
20 また、本反応を行う際、形質転換体として本発明のポリペプチドと補酵素再生能を有する酵素（例えば、グルコース脱水素酵素）の両者を生産するものを用いる場合、反応系に補酵素再生のための基質（例えば、グルコース）を添加することにより、補酵素の使用量を大幅に減らすことが可能である。

基質となるカルボニル基を有する化合物としては、例えば、式 (1)

25



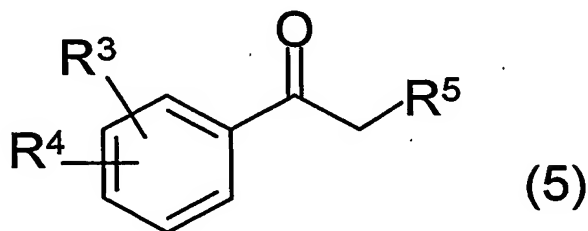
で表される N-ベンジル-3-ピロリジノン、一般式 (3)



5

(式中、 R^1 、 R^2 は水素原子、水酸基又はアルコキシ基を示し、それぞれ同一でも異なってもよい。また、 n は1又は2を示す。) で表される2-テトラロン誘導体、及び、一般式(5)

10

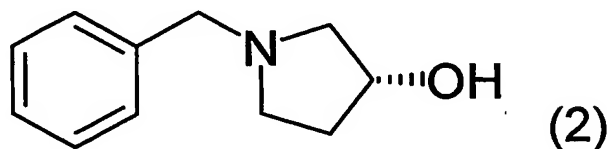


15

(式中、 R^3 、 R^4 は水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基又はニトロ基を示し、それぞれ同一でも異なってもよい。また、 R^5 は水素原子、ハロゲン原子、水酸基又は置換基を有してもよいアルキル基を示す。) で表される1-フェニルエタノン誘導体を挙げることができる。式(3)、(5)で表される化合物としてより詳しくは、例えば、7-メトキシ-2-テトラロン、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オン、2-クロ

20 ロー1-(4'-フルオロフェニル)エタノン、及び2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノンを挙げることができる。

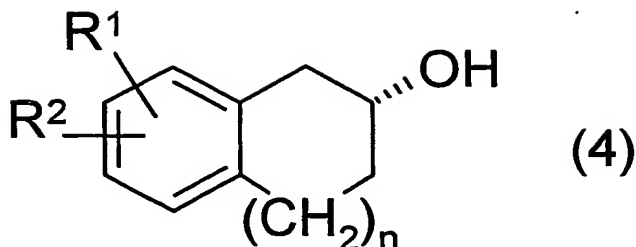
また、上記方法により得られる光学活性アルコールとしては、例えば式(2)



25

で表される(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノール、一般式(4)

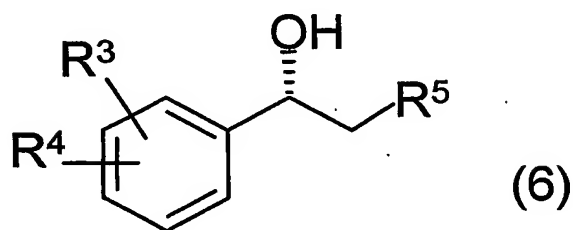
13



5

(式中、 R^1 、 R^2 及び n は前記と同じ)で表される2-テトラロール誘導体、又は、一般式(6)

10



15

(式中、 R^3 、 R^4 、及び、 R^5 は前記と同じ)で表される1-フェニルエタノール誘導体を挙げることができる。式(4)、(6)で表される化合物としてより詳しくは、例えば、7-メトキシ-2-テトラロール、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オール、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノール、又は、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールを挙げることができる。

20

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 におけるアルコキシ基としては、炭素数1~3のアルコキシ基であり、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基等が挙げられる。好ましくはメトキシ基である。

R^3 、 R^4 、 R^5 におけるハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられる。

25

R^5 における置換基を有してもよいアルキル基のアルキル基としては、炭素数1~8のアルキル基であり、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ヘキシル基、オクチル基等が挙げられる。好ましくは炭素数1~2のアルキル基である。 R^5 における置換基を有してもよいアルキル基の置換基としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、水酸基、アミノ基等が挙げられる。

反応には水系溶媒を用いてもよいし、水系溶媒と有機系溶媒を混合して用いて

もよい。有機系溶媒としては、例えば、トルエン、ヘキサン、ジイソプロピルエーテル、酢酸n-ブチル、酢酸エチル等が挙げられる。

反応温度は、10℃～70℃、好ましくは20～40℃であり、反応時間は、1～100時間、好ましくは10～50時間である。また、反応中、反応液のpHは、例えば塩酸、水酸化ナトリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液等を用いて、4～10、好ましくは5～8に維持する。

反応はバッチ方式あるいは連続方式で行われ得る。バッチ方式の場合、反応基質は0.1%から70% (w/v) の仕込み濃度で添加される。

反応で生じた光学活性アルコールは常法により精製し得る。例えば、反応で生じた光学活性アルコールがN-ベンジル-3-ピロリジノール、7-メトキシ-2-テトラロール、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オール、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノール、又は、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールである場合、必要に応じ遠心分離、濾過などの処理を施して反応物から菌体等の懸濁物を除去した後、水酸化ナトリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液、塩酸等で抽出に適したpH (3～11) に調整し、酢酸エチル、トルエン等の有機溶媒で抽出し、有機溶媒を減圧下で除去する。さらに、蒸留、晶析またはクロマトグラフィー等の処理を行うことにより、精製され得る。

N-ベンジル-3-ピロリジノン、及び、N-ベンジル-3-ピロリジノールの定量は、ガスクロマトグラフィー (カラム: Unipore B 10% PEG-20M (ID 3.0 mm × 1.0 m、ジーエルサイエンス社製)、カラム温度: 200℃、キャリアガス: 窒素、検出: FID) で行い得る。

また、N-ベンジル-3-ピロリジノールの光学純度の測定は、高速液体カラムクロマトグラフィー (カラム: Chiralcel OB (ID 4.6 mm × 250 mm、ダイセル化学工業株式会社製)、溶離液: n-ヘキサン/イソプロパノール/ジエチルアミン=99/1/0.1、流速: 1 ml/min、検出: 254 nm、カラム温度: 室温) で行い得る。

7-メトキシ-2-テトラロン、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オン、7-メトキシ-2-テトラロール、

及び、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オールは、高速液体カラムクロマトグラフィー（カラム：ナカライテスク株式会社製COSMOSIL 5C8-MS（ID4. 6mm×250mm）、溶離液：水／アセトニトリル＝1／1、流速：1ml/min、検出：210nm、カラム温度：室温）で行い得る。

また、7-メトキシ-2-テトラロール、及び、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オールは、高速液体カラムクロマトグラフィー（カラム：ダイセル化学工業株式会社製Chiralcel OJ（ID4. 6mm×250mm）、溶離液：n-ヘキサン／イソプロパノール＝9／1、流速：1ml/min、検出：254nm、カラム温度：室温）で行い得る。

2-クロロ-1-（4'-フルオロフェニル）エタノール、2-クロロ-1-（3'-クロロフェニル）エタノール、2-クロロ-1-（4'-フルオロフェニル）エタノール、及び、2-クロロ-1-（3'-クロロフェニル）エタノールの定量は、高速液体カラムクロマトグラフィー（カラム：株式会社ワイエムシイ製YMC-Pack ODS A-303（ID4. 6mm×250mm）、溶離液：水／アセトニトリル＝1／1、流速：1ml/min、検出：210nm、カラム温度：室温）で行い得る。

また、2-クロロ-1-（4'-フルオロフェニル）エタノール、及び、2-クロロ-1-（3'-クロロフェニル）エタノールの光学純度の測定は、高速液体カラムクロマトグラフィー（カラム：ダイセル化学工業株式会社製Chiralcel OJ（ID4. 6mm×250mm）、溶離液：n-ヘキサン／イソプロパノール＝39／1、流速：1ml/min、検出：254nm、カラム温度：室温）で行い得る。

以上のように、本発明に従えば、本発明のポリペプチドの効率的生産が可能であり、それを利用することにより、種々の有用な光学活性アルコールの優れた製造法が提供される。

図1は、本発明のポリヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列を示す図である。

図2は、組換えプラスミドpNTDRG1の作製方法及び構造を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- 5 以下、実施例で本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。なお、以下の実施例において用いた組換えDNA技術に関する詳細な操作方法などは、次の成書に記載されている。

Molecular Cloning 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、
10 Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)。

実施例1 酵素の精製

- 15 以下の方法に従って、デボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina) IFO13584株よりN-ベンジル-3-ピロリジノンを選択的に還元して(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有する酵素を単一に精製した。特に断りのない限り、精製操作は4℃で行った。

- (デボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina) IFO
20 13584株の培養)

2L容坂口フラスコ72本に下記の組成からなる液体培地400mlを分注し、120℃で20分間蒸気殺菌を行った。

培地組成(%は(w/v)で表示)：

- | | |
|-----------------------|--------|
| ポリペプトン | 1.0% |
| 25 イーストエキス | 0.3% |
| 肉エキス | 0.3% |
| モルトエキス | 1.0% |
| NaCl | 0.3% |
| アデカノールLG-109 (日本油脂社製) | 0.003% |

水道水

pH 7.0

この培地に、予め同培地にて前培養しておいたデボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina) IFO13584株の培養液を5mlずつ

- 5 接種し、30℃で、48時間振とう培養した。

(無細胞抽出液の調整)

- 上記の培養液28000mlから遠心分離により菌体を集めた後、生理食塩水で菌体を洗浄し、該菌株の湿菌体363gを得た。この湿菌体を500mlの100mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に懸濁し、SONIFIER 250型超音波破碎機(BRANSON社製)を用いて破碎した。破碎物から遠心分離にて菌体残渣を除き、無細胞抽出液840mlを得た。
- 10

(無細胞抽出液の熱処理および酸処理)

- 上記の無細胞抽出液を入れたビーカーを60℃の恒温水槽に浸け、25分間攪拌した後、氷浴中で4℃まで冷却した。生じた沈殿物を遠心分離にて除いた後、この遠心上清のpHをリン酸を用いて5.0に調整し、氷浴中で3時間攪拌した。生じた沈殿物を再度遠心分離にて除き、粗酵素液830mlを得た。
- 15

(硫酸アンモニウム分画)

- 上記で得た粗酵素液のpHをアンモニア水を用いて7.0に調整した後、35%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加、溶解し、生じた沈殿を遠心分離により除いた(この際粗酵素液のpHをアンモニア水でpH 7.0に維持しながら行った)。先と同様pH 7.0を維持しながら、この遠心上清に55%飽和となるようさらに硫酸アンモニウムを添加、溶解し、生じた沈殿を遠心分離により集めた。この沈殿を50mlの10mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解した後、同一緩衝液で1夜透析し、粗酵素液83mlを得た。
- 20

- 25 (DEAE-TOYOPEARLカラムクロマトグラフィー)

上記硫酸アンモニウム分画で得られた粗酵素液のpHをアンモニア水を用いて8.0に調整した。これを、10mMリン酸緩衝液(pH 8.0)で予め平衡化したDEAE-TOYOPEARL 650M(東ソー株式会社製)カラム(250ml)に供し、同一緩衝液で活性画分を溶出させた。活性画分を集め、リン

酸を添加してpH 7.0に調製した。

(Phenyl-TOYOPEARLカラムクロマトグラフィー)

- 上記DEAE-TOYOPEARLカラムクロマトグラフィーで得られた粗酵素液に終濃度1Mとなるよう硫酸アンモニウムを溶解し（この際、粗酵素液にアンモニア水を添加してpH 7.0に維持しながら行った）、1Mの硫酸アンモニウムを含む10mMリン酸緩衝液（pH 7.0）で予め平衡化したPhenyl-TOYOPEARL 650M（東ソー株式会社製）カラム（100ml）に供し、活性画分を吸着させた。同一緩衝液でカラムを洗浄した後、硫酸アンモニウムのリニアグラジエント（1Mから0Mまで）により活性画分を溶出させた。
- 10 活性画分を集め、10mMリン酸緩衝液（pH 7.0）にて1夜透析を行い、電気泳動的に単一の精製酵素標品を得た。以後、この酵素をRDRと呼ぶことにする。

実施例2 酵素の性質の測定

- 15 実施例1で得られたRDRの酵素学的性質について検討した。酵素活性の測定は、基本的には、100mMリン酸緩衝液（pH 6.5）に、基質N-ベンジル-3-ピロリジノン5mM、補酵素NADH 0.25mMおよび酵素を添加し、30℃で1分間反応させ、波長340nmの吸光度の減少を測定することにより行った。

20 (1) 作用

NADHを補酵素として、N-ベンジル-3-ピロリジノンに作用し、光学純度99.9%以上の(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成した。NADPHを補酵素として上記方法に準じて酵素活性を測定した場合、NADHを補酵素とした場合の約0.6%の活性を示した。

25 (2) 作用至適pH

緩衝液として100mMリン酸緩衝液および100mM酢酸緩衝液を用いて、pHを4.0から8.0の範囲とした以外は、上記酵素活性の測定と同様にして酵素活性を測定した。その結果、N-ベンジル-3-ピロリジノンに作用する至適pHは5.5から6.0であった。

(3) 作用至適温度

温度を20℃から60℃とした以外は、上記酵素活性の測定と同様にして、酵素活性を測定した。その結果、N-ベンジル-L-プロリンに作用する至適温度は50℃から55℃であった。

5 (4) 分子量

溶離液として150mMの塩化ナトリウムを含む50mMリン酸緩衝液(pH 7.0)を用い、TSK-GEL G3000 SWXLカラム(東ソー株式会社製)による精製酵素RDRのゲル濾過クロマトグラフィー分析を行った結果、標準タンパク質との相対保持時間から算出した本酵素の分子量は約55000であった。また、酵素のサブユニットの分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、標準タンパク質との相対移動度から算出した。本酵素のサブユニットの分子量は約28000であった。

実施例3 RDR遺伝子のクローニング

15 (PCRプライマーの作成)

実施例1で得られた精製RDRを8M尿素存在下で変性した後、アクロモバクター由来のリシルエンドペプチダーゼ(和光純薬工業株式会社製)で消化し、得られたペプチド断片のアミノ酸配列をABI492型プロテインシーケンサー(パーキンエルマー社製)により決定した。このアミノ酸配列をもとに、DNAプライマー2種(プライマー1:配列番号3、プライマー2:配列番号4)を常法に従って合成した。

(PCRによるRDR遺伝子の増幅)

デボシア・リボフラビナ(Devosia riboflavina) IFO 13584株の培養菌体からMurray等の方法(Nucl., Acids Res. 8:4321-4325(1980))に従って染色体DNAを抽出した。次に、上記で調製したDNAプライマーを用い、得られた染色体DNAを鋳型としてPCRを行ったところ、RDR遺伝子の一部と考えられる約700bpのDNA断片が増幅された(PCRは、DNAポリメラーゼとしてTaKaRa Ex Taq(宝酒造株式会社製)を用いて行い、反応条件はその取り扱い説

明書に従った。)。このDNA断片を、プラスミドpT7Blue T-Vect
tor (Novagen社製) にクローニングし、ABI PRISM Dye
Terminator Cycle Sequencing Ready R
eaction Kit (Perkin Elmer社製) およびABI 37
5 3A DNA Sequencer (Perkin Elmer社製) を用いて
その塩基配列を確認した。

(i-PCR法によるRDR遺伝子の全長配列の決定)

デボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina) IFO
13584株の染色体DNAを制限酵素EcoRIで完全消化し、得られたDN
A断片の混合物をT4リガーゼにより分子内環化させた。これを鋳型として用い、
10 前項で判明したRDR遺伝子の部分塩基配列情報をもとに、i-PCR法 (Nu
cl. Acids Res. 16, 8186 (1988)) により、染色体DN
A上のRDR遺伝子の全塩基配列を決定した (PCRは、DNAポリメラーゼと
してTakara Ex Taq (宝酒造株式会社製) を用いて行い、反応条件
15 はその取り扱い説明書に従った。また、塩基配列の決定は先と同様に行った)。

その塩基配列を図1に示した。また、塩基配列がコードするアミノ酸配列を塩
基配列の下段に示した。このアミノ酸配列と、精製RDRのリシルエンドペプチ
ダーゼ消化断片の部分アミノ酸配列を比較した結果、精製RDRの部分アミノ酸
配列は全て、このアミノ酸配列中に存在した。図1中のアミノ酸配列において、
20 精製RDRの部分アミノ酸配列と一致した部分には下線を付した。なお、図1の
塩基配列及びアミノ酸配列は、配列表の配列番号2のものと同一である。

実施例4 RDR遺伝子を含む組換えプラスミドの作製

実施例3で決定された塩基配列を基に、RDR遺伝子の開始コドン部分にNd
25 eI部位を付加したN末端DNAプライマー (プライマー3: 配列番号5)、お
よび同遺伝子の3'末端の直後にEcoRI部位を付加したC末端DNAプライ
マー (プライマー4: 配列番号6) を合成した。次に、この2種のDNAをプ
ライマーとして用い、実施例3で調製したデボシア・リボフラビナ (Devosi
a riboflavina) IFO13584株の染色体DNAを鋳型として

PCRを行い、開始コドン部分にNde I 部位を付加し、3' 末端の直後にEcoRI 切断点を付加した、RDR遺伝子を増幅した（PCRは、DNAポリメラーゼとしてTakara Ex Taq（宝酒造株式会社製）を用いて行い、反応条件はその取り扱い説明書に従った。）。これを、Nde I およびEcoRI
5 で消化し、プラスミドpUCNT（WO94/03613）のlacプロモーターの下流のNde I-EcoRI 部位に挿入することにより、組換えプラスミドpNTDRを得た。

実施例5 RDR遺伝子およびグルコース脱水素酵素遺伝子の両者を含む組換え 10 プラスミドの作製

バシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) IAM
1030株由来のグルコース脱水素酵素（以後、GDHと称する）の遺伝子の塩基配列情報（Eur. J. Biochem. 186, 389（1989））を基に、GDHの構造遺伝子の開始コドンから5塩基上流に大腸菌のShaine-Dalgarno配列（9塩基）を、さらにその直前にEcoRI 切断点を付加したN末端DNAプライマー（プライマー5：配列番号7）と、GDHの構造遺伝子の終始コドンの直後にSal I 部位を付加したC末端DNAプライマー（プライマー6：配列番号8）を常法に従って合成した。これら2つのDNAプライマーを用い、プラスミドpGDK1（Eur. J. Biochem. 186, 3
15 89（1989））を鋳型としてPCRにより二本鎖DNAを合成した。このDNA断片をEcoRI およびSal I で消化し、プラスミドpUCNT（WO94/03613）のlacプロモーターの下流のEcoRI-Sal I 部位に挿入することにより、組換えプラスミドpNTG1を得た。次に、実施例4で調製したpNTDRをNde I およびEcoRI で消化して得られるRDR遺伝子を、
20 このpNTG1上のGDH遺伝子の上流に存在するNde I-EcoRI 部位に挿入し、プラスミドpNTDRG1を得た。pNTDRG1の作製法および構造を図2に示す。

実施例6 組換え大腸菌の作製

実施例4および5で得た組換えプラスミドpNTDR又はpNTDRG1を用いて大腸菌HB101（宝酒造株式会社製）を形質転換し、組換え大腸菌HB101（pNTDR）およびHB101（pNTDRG1）を得た。

こうして得られた形質転換体E. coli HB101（pNTDR）および
5 E. coli HB101（pNTDRG1）は、それぞれ、受託番号FERM
BP-08457およびFERM BP-08458として、平成15年8月
25日付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6にある独立行政法
人産業技術総合研究所に寄託されている。

10 実施例7 組換え大腸菌におけるRDRの生産

実施例6で得た組換え大腸菌HB101（pNTDR）を120μg/mlの
アンピシリンを含む2×YT培地で培養し、遠心分離により集菌後、100mM
リン酸緩衝液（pH6.5）に懸濁し、UH-50型超音波ホモゲナイザー（S
MT社製）を用いて破碎し、無細胞抽出液を得た。

15 この無細胞抽出液のRDR活性を以下のように測定した。RDR活性の測定は、
100mMリン酸緩衝液（pH6.5）に、基質N-ベンジル-L-プロリジノ
ン5mM、補酵素NADH0.25mMおよび酵素を添加し、30℃で波長34
0nmの吸光度の減少を測定することにより行った。この反応条件において、1
分間に1μmolのNADHをNADに酸化する酵素活性を1unitと定義し
20 た。この様に測定した無細胞抽出液中のRDR活性を比活性として表し、ベクタ
ープラスミドを保持する形質転換体と比較した。また、実施例1と同様の方法で
調製したデボシア・リボフラビナ（Devosia riboflavina）
IFO13584株の無細胞抽出液中のRDR活性についても同様に比較した。
それらの結果を表1に示す。

25 大腸菌HB101（pNTDR）では、ベクタープラスミドのみの形質転換体
である大腸菌HB101（pUCNT）と比較して明らかなRDR活性の増加が
見られ、デボシア・リボフラビナ（Devosia riboflavina）
IFO13584株と比較して、比活性は約17倍に達した。

表 1

菌株名	RDR比活性 (U/mg)
<i>E. coli</i> HB101 (pUCNT)	<0.01
<i>E. coli</i> HB101 (pNTDR)	0.67
<i>Devosia riboflavina</i> IF013584	0.04

実施例 8 組換え大腸菌における RDR および GDH の同時生産

実施例 6 で得た組換え大腸菌 HB101 (pNTDRG1) を、実施例 7 と同様に処理して得られる無細胞抽出液の GDH 活性を、以下のように測定した。GDH 活性の測定は 1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に、基質グルコース 0.1 M、補酵素 NADP 2 mM 及び酵素を添加し、25℃で波長 340 nm の吸光度の増加を測定することにより行った。この反応条件において、1 分間に 1 μ mol の NADP を NADPH に還元する酵素活性を 1 unit と定義した。また、RDR 活性についても実施例 7 と同様に測定した。

このように測定した無細胞抽出液中の RDR および GDH 活性を比活性として表し、大腸菌 HB101 (pNTDR) およびベクターのみの形質転換体 HB101 (pUCNT) と比較した結果を表 2 に示す。大腸菌 HB101 (pNTDRG1) では、ベクタープラスミドのみの形質転換体である大腸菌 HB101 (pUCNT) と比較して、明らかな RDR および GDH 活性の増加が見られた。

表 2

菌株名	RDR比活性 (U/mg)	GDH比活性 (U/mg)
<i>E. coli</i> HB101 (pUCNT)	<0.01	<0.01
<i>E. coli</i> HB101 (pNTDR)	0.67	<0.01
<i>E. coli</i> HB101 (pNTDRG1)	0.47	111

実施例 9 RDR および グルコース脱水素酵素を同時生産させた組換え大腸菌を用いた N-ベンジル-3-ピロリジノンからの (R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールの合成

実施例 8 で得られた組換え大腸菌 HB101 (pNTDRG1) の培養液を、

SONIFIRE 250 (BRANSON社製) を用いて超音波破碎した。この菌体破碎液 20 ml にグルコース 2 g、NAD 1 mg、N-ベンジル-3-ピロリジノン 1 g を添加した。この反応液を、5 M の塩酸および水酸化ナトリウム水溶液を添加することにより pH 6.5 に調整しつつ、窒素雰囲気下、30℃で 18 時間攪拌した。反応終了後、5 M の水酸化ナトリウム水溶液 2 ml を添加し、反応液をトルエンで抽出した。抽出液をエバポレーターで脱溶剤した後、抽出物の分析を行ったところ、収率 96% で N-ベンジル-3-ピロリジノールが得られた。この際、生成した N-ベンジル-3-ピロリジノールは光学純度 99.9% ee の R 体であった。

- 10 N-ベンジル-3-ピロリジノン、及び、N-ベンジル-3-ピロリジノールの定量は、ガスクロマトグラフィー (カラム: Unipore B 10% PEG-20M (ID 3.0 mm × 1.0 m、ジーエルサイエンス社製)、カラム温度: 200℃、キャリアガス: 窒素、検出: FID) で行った。

- また、N-ベンジル-3-ピロリジノールの光学純度の測定は、高速液体カラム
15 クロマトグラフィー (カラム: Chiralcel OB (ID 4.6 mm × 250 mm、ダイセル化学工業社製)、溶離液: n-ヘキサン/イソプロパノール/ジエチルアミン = 99/1/0.1、流速: 1 ml/min、検出: 254 nm、カラム温度: 室温) で行った。

- 20 実施例 10 RDR およびグルコース脱水素酵素を同時生産させた組換え大腸菌を用いた 7-メトキシ-2-テトラロンからの (R)-7-メトキシ-2-テトラロールの合成

- 実施例 8 で得られた組換え大腸菌 HB101 (pNTDRG1) の培養液 20 ml にグルコース 3 g、NAD 2 mg、7-メトキシ-2-テトラロン 2 g を添加し、5 M の水酸化ナトリウム水溶液の滴下により pH 6.5 に調整しつつ、窒素雰囲気下、30℃で 15 時間攪拌した。この反応液をトルエンで抽出し、脱溶剤した後、抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、7-メトキシ-2-テトラロール 1.7 g を得た。光学純度を測定した結果、生成した 7-メトキシ-2-テトラロールは光学純度 99.9% ee の R 体であった。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ ppm 1.62 (s, 1H), 1.73~1.87 (m, 1H), 1.98~2.08 (m, 1H), 2.70~2.81 (m, 2H), 2.88 (app dt, 1H), 3.05 (dd, 1H), 3.76 (s, 3H), 4.09~4.19 (m, 1H), 6.61 (d, 1H), 6.69 (dd, 1H), 7.00 (d, 1H)

7-メトキシ-2-テトラロン、及び、7-メトキシ-2-テトラロールの定量は、高速液体カラムクロマトグラフィー（カラム：ナカライテスク株式会社製 COSMOSIL 5C8-MS (ID4.6mm×250mm)、溶離液：水／アセトニトリル＝1／1、流速：1ml/min、検出：210nm、カラム温度：室温）で行った。

また、7-メトキシ-2-テトラロールの光学純度の測定は、高速液体カラムクロマトグラフィー（カラム：ダイセル化学工業株式会社製 Chiralcel OJ (ID4.6mm×250mm)、溶離液：n-ヘキサン／イソプロパノール＝9／1、流速：1ml/min、検出：254nm、カラム温度：室温）で行った。

実施例11 RDRおよびグルコース脱水素酵素を同時生産させた組換え大腸菌を用いた3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オンからの(R)-3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オールの合成

実施例8で得られた組換え大腸菌HB101 (pNTDRG1)の培養液20mlにグルコース3g、NAD2mg、50% (w/w)の3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オンのトルエン溶液4gを添加し、5Mの水酸化ナトリウム水溶液の滴下によりpH6.5に調整しつつ、窒素雰囲気下、30℃で18時間攪拌した。この反応液をトルエンで抽出し、脱溶剤した後、抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オール1.6gを得た。光学純度を測定した結果、生成した3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オールは光

学純度 99.9% ee の R 体であった。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ ppm 1.40~1.65 (m, 2H), 1.70~1.95 (m, 2H), 1.95~2.20 (m, 1H), 2.65~2.75 (m, 2H), 2.90~3.10 (m, 2H), 3.78 (s, 3H),
5 3.65~3.90 (m, 1H), 6.66 (dd, 1H), 6.73 (d, 1H), 6.98 (d, 1H)

3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オン、及び、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オール
10 カラム：ナカライテスク株式会社製 COSMOSIL 5C8-MS (ID4.6 mm×250 mm)、溶離液：水/アセトニトリル=1/1、流速：1 ml/min、検出：210 nm、カラム温度：室温)で行った。

また、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オールの光学純度の測定は、高速液体カラムクロマトグラフィー
15 カラム：ダイセル化学工業株式会社製 Chiralcel OJ (ID4.6 mm×250 mm)、溶離液：n-ヘキサン/イソプロパノール=9/1、流速：1 ml/min、検出：254 nm、カラム温度：室温)で行った。

実施例 12 RDR および グルコース 脱水素酵素 を 同時 発現 させた 組換え 大腸菌
20 を用いた 2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノンからの (S)-
2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノールの合成

実施例 8 で得られた組換え大腸菌 HB101 (pNTDRG1) の培養液 50 ml にグルコース 10 g、NAD 5 mg、及び、50% (w/w) の 2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノンのトルエン溶液 10 g を添加し、5
25 M の水酸化ナトリウム水溶液の滴下により pH 6.5 に調整しつつ、30℃で 2 時間攪拌した。この反応液をトルエンで抽出し、脱溶剤した後、蒸留 (110℃, 0.8 mmHg) し、無色オイル状の 2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノール 4.1 g を得た。光学純度を測定した結果、生成した 2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノールは光学純度 99.9% ee の

S体であった。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ ppm 3.10 (s, 1H), 3.61 (dd, 1H), 3.70 (dd, 1H), 4.88 (dd, 1H), 7.06 (m, 2H), 7.35 (m, 2H)

5 2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノン、及び、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノールの定量は、高速液体カラムクロマトグラフィー（カラム：株式会社ワイエムシイ製YMC-Pack ODS A-303 (ID 4.6 mm \times 250 mm)、溶離液：水/アセトニトリル=1/1、流速：1 ml/min、検出：210 nm、カラム温度：室温）で行った。

10 また、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノールの光学純度の測定は、高速液体カラムクロマトグラフィー（カラム：ダイセル化学工業株式会社製Chiralcel OJ (ID 4.6 mm \times 250 mm)、溶離液：n-ヘキサン/イソプロパノール=39/1、流速：1 ml/min、検出：254 nm、カラム温度：室温）で行った。

15

実施例13 RDRおよびグルコース脱水素酵素を同時発現させた組換え大腸菌を用いた2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノンからの(S)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールの合成

実施例8で得られた組換え大腸菌HB101 (pNTDRG1)の培養液50
20 mlにグルコース10 g、NAD5 mg、及び、50% (w/w)の2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールのトルエン溶液10 gを添加し、5Mの水酸化ナトリウム水溶液の滴下によりpH6.5に調整しつつ、30℃で22時間攪拌した。この反応液をトルエンで抽出し、脱溶剤した後、抽出物の分析を行った。その結果、収率97%で2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エ
25 タノールが得られた。この際、生成した2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールは光学純度99.9% eeのS体であった。

2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノン、及び、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールの定量は、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノン、及び、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)

) エタノールの場合と同様に行った。また、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノールの光学純度の測定は、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル) エタノールの場合と同様に行った。

5 実施例 14 RDRの基質特異性

- 0.33% (v/v) のジメチルスルフォキシドを含む100mMリン酸緩衝液 (pH 6.5) に、基質となる表3の各種カルボニル化合物を終濃度1mM、補酵素NADHを終濃度0.25mMとなるようそれぞれ溶解した。これにRDRを添加し、30℃で波長340nmの吸光度の減少を測定した。この反応条件
- 10 において、1分間に1 μ molのNADHをNADに酸化する酵素活性を1 unitと定義した。そして、各種カルボニル化合物に対する活性を、N-ベンジル-3-ピロリジノンに対する活性を100%とした場合の相対値で表し、表3に示した。RDRは非常に広範なカルボニル化合物に対して還元活性を示した。

表 3

還元酵素RDRの基質特異性

反応基質		活性比 (%)	反応基質		活性比 (%)
5	N-benzyl-3-pyrrolidinone	100	tert-butyl acetoacetate		5634
			ethyl 2-methylacetoacetate		239
	2-acetylpyridine	13	ethyl 2-chloroacetoacetate		8907
	3-acetylpyridine	788	ethyl 2-eneacetoacetate		429
	4-acetylpyridine	6448	ethyl 2-oxodecanoate		18
10	2-acetylpyrrole	70			
			ethyl 4-chloroacetoacetate		683
	acetophenone	181	n-octyl 4-chloroacetoacetate		224
	m-hydroxyacetophenone	61	ethyl 4-bromoacetoacetate		4099
	m-nitroacetophenone	6927	ethyl 4-azideacetoacetate		804
	p-chloroacetophenone	2354	ethyl 4-hydroxyacetoacetate		1774
	4-fluoroacetophenone	366	ethyl 4-benzoyloxyacetoacetate		3186
	3,4-dimethoxyacetophenone	2073	ethyl 4-acetoxyacetoacetate		4234
	p-methylacetophenone	521	benzyl acetoacetate		2015
	2-hydroxyacetophenone	30	ethyl benzoylacetate		98
15	2-chloro-1-(3'-chlorophenyl) ethanone	463	ethyl 2-chloro-3-oxo-3-phenylpropionate		52
	1-phenyl-2-butanone	147	benzaldehyde		21
	propiophenone	27	2-pyridinecarbaldehyde		82
	benzoin	13	pyridine-4-aldehyde		441
	benzylacetone	410	o-chlorobenzaldehyde		9
	acetone	194	m-chlorobenzaldehyde		301
	2-butanone	280	p-chlorobenzaldehyde		117
			o-nitrobenzaldehyde		33
	2-hexanone	5043	m-nitrobenzaldehyde		683
20	2-heptanone	2777	p-nitrobenzaldehyde		1296
	diethyl ketone	32			
	chloroacetone	4170	propionaldehyde		204
	hydroxyacetone	100	n-butylaldehyde		728
	4-hydroxy-2-butanone	33	n-hexylaldehyde		2225
	diacetyl	1614	2-phenylpropionaldehyde		706
	acetylacetone	1354	3-phenylpropionaldehyde		685
			methyl glyoxal		345
	4-methyl-2-pentanone	962	glutaraldehyde		1339
	cyclopropyl methyl ketone	20			
25	cyclopentanone	103	7-methoxy-2-tetoralone		7084
	dihydro-4,4-dimethyl-2,3-furandione	1314	6-methoxy-2-tetoralone		156
			6,7-dimethoxy-2-tetoralone		2267
	ethyl 3-oxocyclopentane carboxylate	87	2-tetoralone		1721
	methyl pyruvate	1889			
	ethyl pyruvate	6232	2-keto-n-butyric acid		15
	methyl acetoacetate	8341	oxalacetic acid		14
	ethyl acetoacetate	4236	levulinic acid		11

産業上の利用可能性

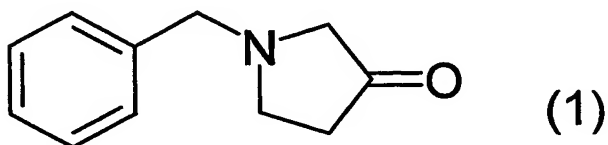
- N-ベンジル-3-ピロリジノンを経立体選択的に還元して (R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有するポリペプチド遺伝子のクローニング、およびそのヌクレオチド配列の解析により、該ポリペプチド産生能の高い
- 5 形質転換体を得ることが可能になった。また、該ポリペプチドおよびグルコース脱水素酵素を同時に高生産する能力を有する形質転換体をも得ることが可能になった。さらに、これらの形質転換体を用いることにより、種々のカルボニル化合物から光学活性アルコールを効率良く合成することが可能となった。

請求の範囲

1. 以下の(1)から(4)の理化学的性質を有するポリペプチド:

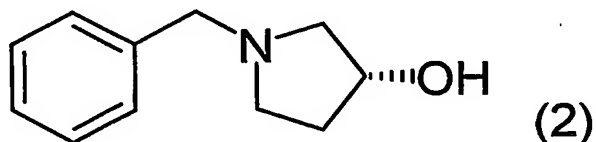
(1) 作用: NADHまたはNADPHを補酵素として、式(1)

5



で表されるN-ベンジル-3-ピロリジノンを経立選択的に還元して、式(2)

10



で表される(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する、

15

(2) 作用至適pH: 5.5から6.0、

(3) 作用至適温度: 50℃から55℃、

(4) 分子量: ゲル濾過分析において約55000、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動分析において約28000。

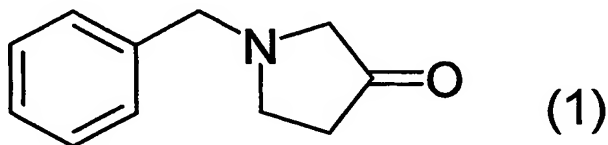
20

2. 以下の(a)又は(b)のポリペプチド:

(a) 配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列からなるポリペプチド

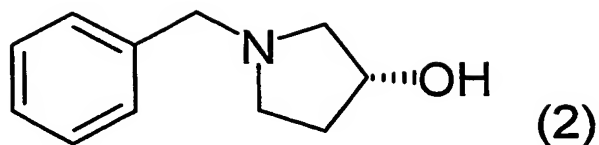
(b) 配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列または配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、式(1)

25



で表されるN-ベンジル-3-ピロリジノンを経立選択的に還元して、式(2)

32



- 5 で表される (R) -N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有するポリペプチド。

3. ポリペプチドがデボシア (Devosia) 属に属する微生物に由来する請求の範囲第1または2項に記載のポリペプチド。

10

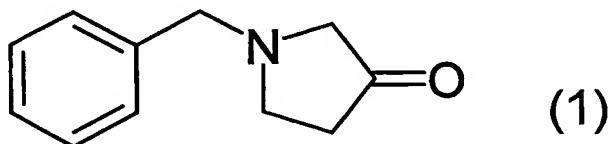
4. デボシア属に属する微生物が、デボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina) IFO13584株である請求の範囲第3項記載のポリペプチド。

- 15 5. 請求の範囲第1から4項のいずれかに記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

6. 以下の (c) 又は (d) のポリヌクレオチド:

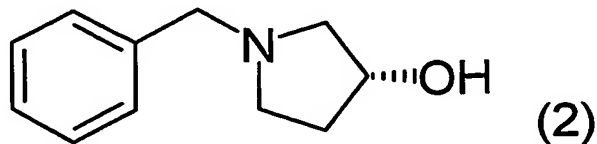
(c) 配列表の配列番号2に示した塩基配列からなるポリヌクレオチド

- 20 (d) 配列表の配列番号2に示した塩基配列と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、式(1)



25

で表されるN-ベンジル-3-ピロリジノンに立体選択的に還元して、式(2)



で表される (R) -N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

7. 請求の範囲第5または6項に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

5

8. プラスミド pNTDR である請求の範囲第7項記載の発現ベクター。

9. グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求の範囲第7項に記載の発現ベクター。

10

10. 前記グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドがバシラス・メガテリウム (Bacillus megaterium) 由来のグルコース脱水素酵素である、請求の範囲第9項に記載の発現ベクター。

15 11. プラスミド pNTDRG1 である請求の範囲第10項に記載の発現ベクター。

12. 請求の範囲第7から11項のいずれかに記載の発現ベクターを用いて宿主細胞を形質転換して得られた形質転換体。

20

13. 前記宿主細胞が大腸菌である請求の範囲第12項に記載の形質転換体。

14. E. coli HB101 (pNTDR) (FERM BP-08457) である請求の範囲第13項に記載の形質転換体。

25

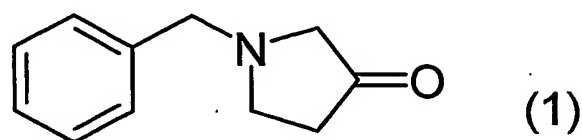
15. E. coli HB101 (pNTDRG1) (FERM BP-08458) である請求の範囲第13項に記載の形質転換体。

16. 請求の範囲第12から15項のいずれかに記載の形質転換体の培養物ま

たはその処理物を、カルボニル基を有する化合物と反応させることを特徴とする光学活性アルコールの製造方法。

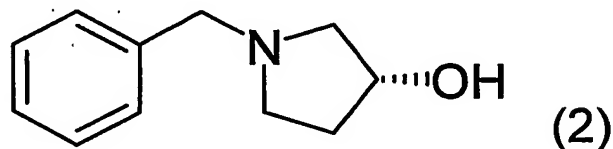
1 7. 前記カルボニル基を有する化合物が、式 (1)

5



で表されるN-ベンジル-3-ピロリジノンであり、前記光学活性アルコールが、
式 (2)

10

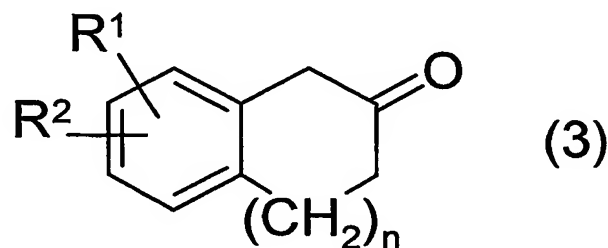


で表される (R) -N-ベンジル-3-ピロリジノールである、請求の範囲第 1
6 項に記載の製造方法。

15

1 8. 前記カルボニル基を有する化合物が、一般式 (3)

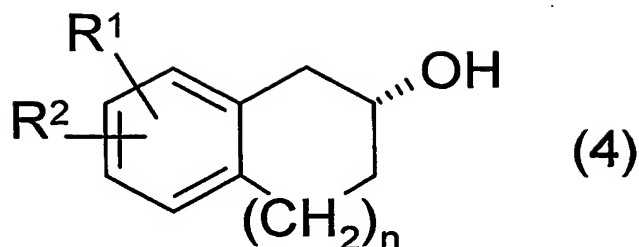
20



(式中、 R^1 、 R^2 は水素原子、水酸基又はアルコキシ基を示し、それぞれ同一でも異なってもよい。また、 n は1又は2を示す。) で表される2-テトラロン誘導体であり、前記光学活性アルコールが、一般式 (4)

25

35



5

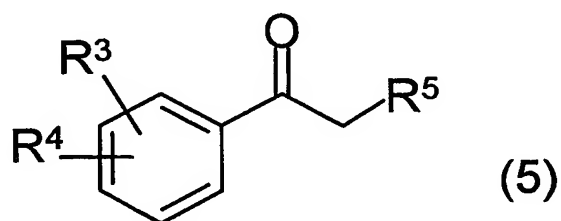
(式中、 R^1 、 R^2 及び n は前記と同じ)で表される2-テトラロール誘導体である請求の範囲第16項に記載の製造方法。

19. 前記2-テトラロン誘導体が7-メトキシ-2-テトラロンであり、前記2-テトラロール誘導体が(R)-7-メトキシ-2-テトラロールである請求の範囲第18項に記載の製造方法。

20. 前記2-テトラロン誘導体が3-メトキシ-6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オンであり、前記2-テトラロール誘導体が(R)-3-メトキシ-6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オールである請求の範囲第18項に記載の製造方法。

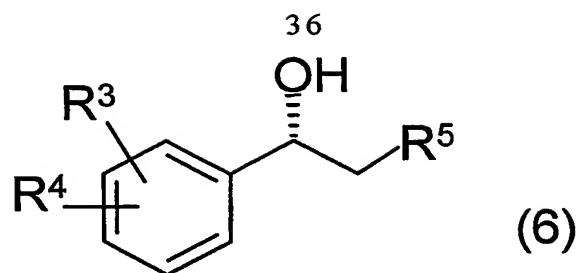
21. 前記カルボニル基を有する化合物が、一般式(5)

20



(式中、 R^3 、 R^4 は水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基又はニトロ基を示し、それぞれ同一でも異なってもよい。また、 R^5 は水素原子、ハロゲン原子、水酸基又は置換基を有してもよいアルキル基を示す。)で表される1-フェニルエタノン誘導体であり、前記光学活性アルコールが、一般式(6)

25



5

(式中、 R^3 、 R^4 、及び、 R^5 は前記と同じ) で表される 1-フェニルエタノール誘導体である請求の範囲第 16 項に記載の製造方法。

22. 前記 1-フェニルエタノン誘導体が 2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノンであり、前記 1-フェニルエタノール誘導体が (S)-2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノールである、請求の範囲第 21 項に記載の製造方法。

23. 前記 1-フェニルエタノン誘導体が 2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノンであり、前記 1-フェニルエタノール誘導体が (S)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールである請求の範囲第 21 項に記載の製造方法。

1/2

☒ 1

1 ATGTCCCAGGATTTTTCAGGCAAGGTCGCATTTCGTAACGGGTGGTGCCTCGGGCATCGGT 60
M S Q D F S G K V A F V T G G A S G I G

61 GAGGCGGTTCGTC AAGCAGCTTGCCGCGCGCGGCCAAGGTTGTGGTTGCCGATCTCAAG 120
E A V V K Q L A A R G A K V V V A D L K

121 CTCGAAGGCGCGCAGGCGGTTGCCGATGCGGTCAAGGCCGCCGGCGGCGAAGCGGCCGCG 180
L E G A Q A V A D A V K A A G G E A A A

181 GTAGCTGTCGATGTCGCCAAGGCCGATCAGGTGGAGAAGGCTGTCCAGTTCGCCGTCGAC 240
V A V D V A K A D Q V E K A V Q F A V D

241 ACCTTTGGCGCCCTGCATCTGGCGGTCAATAATGCCGGCATTGGCGGGCGCTTCCGCTCCC 300
T F G A L H L A V N N A G I G G A S A P

301 CTCGGCGATTATTCCTTCGACGACTGGCATAGGGTTATCGACGTCAATCTCAATTCCGTC 360
L G D Y S F D D W H R V I D V N L N S V

361 TTCTATTCGATGAAGTACGAGATCGTCGCCATGCTCAGGGCAGGCGGTGGCGCCATCGTC 420
F Y S M K Y E I V A M L R A G G G A I V

421 AACATGGCCTCCATCCTCGGCTCGGTGACCTTTCCCAATGCACCGGCCTATGTCACCGCC 480
N M A S I L G S V T F P N A P A Y V T A

481 AAGCACGGCGTGGTTCGGCATGACCAAGTCGGCCGCGGTGGACTATGCCAAAAGGGCATT 540
K H G V V G M T K S A A V D Y A K K G I

541 CGCGTCACGGCCGTCGGGCCCCGGTTTCATCGACACGCCGCTCCTATCCGCCTTGCCCAAG 600
R V T A V G P G F I D T P L L S A L P K

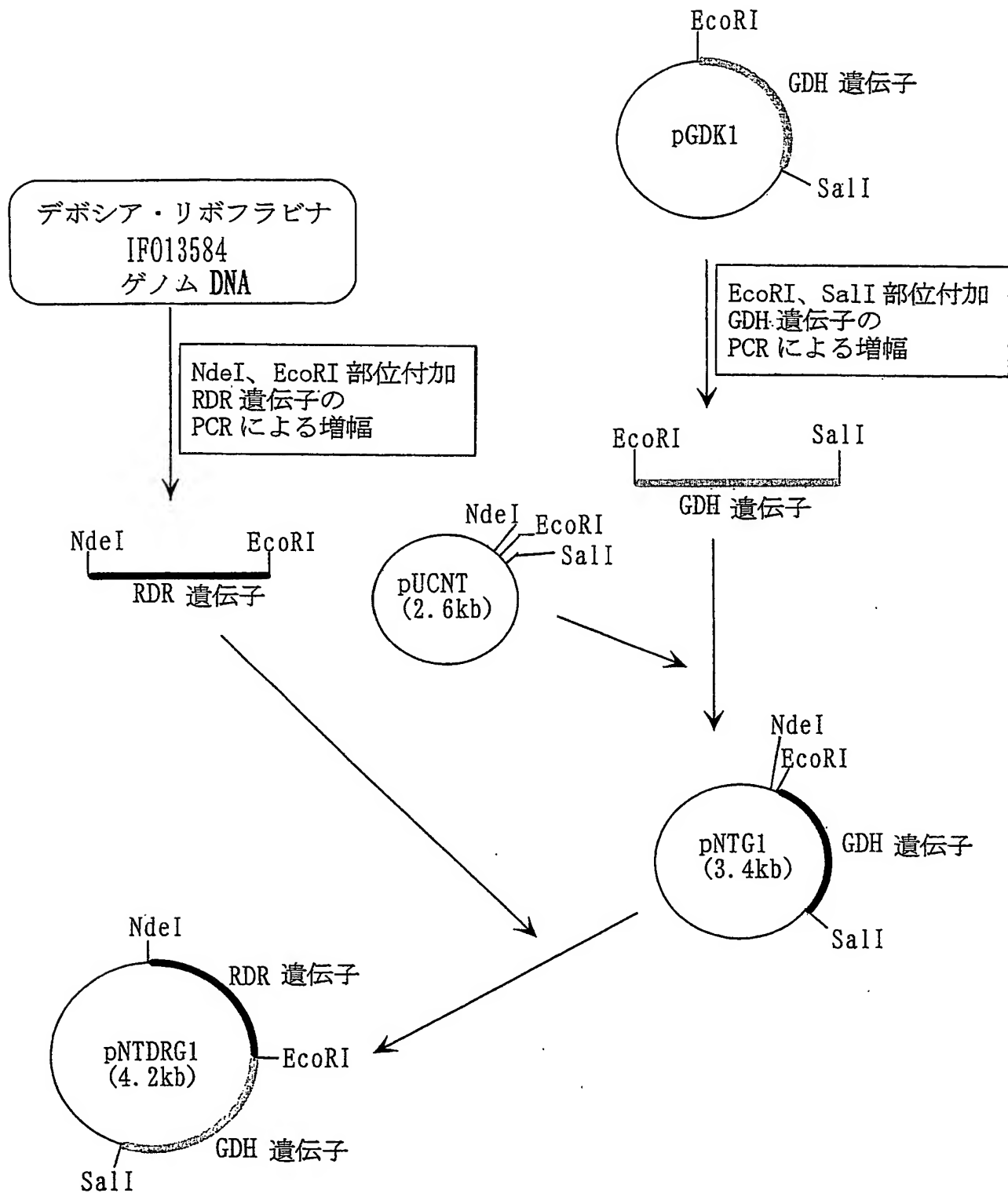
601 GAAACCCTGGACTACCTCAAATCCGTCCATCCGATCGGACGGCTGGGTACCTCGGATGAA 660
E T L D Y L K S V H P I G R L G T S D E

661 GTCGCAGCGCTGACCGGTTCTGCTCTCCGATGCAGCGTCGAACATCACCGGCTCCTAT 720
V A A L T A F L L S D A A S N I T G S Y

721 CACCTGGTCGATGGCGGCTACGTCGCCCAATAG 753
H L V D G G Y V A Q *

2 / 2

図 2



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> 鐘淵化学工業株式会社 KANEKA CORPORATION

5

<120> 新規カルボニル還元酵素、その遺伝子、およびその利用法

<130> T737/MAT-GT

10 <150>JP2002-272976

<151>2002-9-19

<160> 8

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 250

<212> PRT

20 <213> Devosia riboflavina

<400> 1

Met Ser Gln Asp Phe Ser Gly Lys Val Ala Phe Val Thr Gly Gly Ala

1

5

10

15

25 Ser Gly Ile Gly Glu Ala Val Val Lys Gln Leu Ala Ala Arg Gly Ala

20

25

30

Lys Val Val Val Ala Asp Leu Lys Leu Glu Gly Ala Gln Ala Val Ala

35

40

45

Asp Ala Val Lys Ala Ala Gly Gly Glu Ala Ala Ala Val Ala Val Asp

2 / 7

	50	55	60	
	Val Ala Lys Ala Asp Gln Val Glu Lys Ala Val Gln Phe Ala Val Asp			
	65	70	75	80
	Thr Phe Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly			
5		85	90	95
	Ala Ser Ala Pro Leu Gly Asp Tyr Ser Phe Asp Asp Trp His Arg Val			
	100	105	110	
	Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Phe Tyr Ser Met Lys Tyr Glu Ile			
	115	120	125	
10	Val Ala Met Leu Arg Ala Gly Gly Gly Ala Ile Val Asn Met Ala Ser			
	130	135	140	
	Ile Leu Gly Ser Val Thr Phe Pro Asn Ala Pro Ala Tyr Val Thr Ala			
	145	150	155	160
	Lys His Gly Val Val Gly Met Thr Lys Ser Ala Ala Val Asp Tyr Ala			
15		165	170	175
	Lys Lys Gly Ile Arg Val Thr Ala Val Gly Pro Gly Phe Ile Asp Thr			
	180	185	190	
	Pro Leu Leu Ser Ala Leu Pro Lys Glu Thr Leu Asp Tyr Leu Lys Ser			
	195	200	205	
20	Val His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ser Asp Glu Val Ala Ala Leu			
	210	215	220	
	Thr Ala Phe Leu Leu Ser Asp Ala Ala Ser Asn Ile Thr Gly Ser Tyr			
	225	230	235	240
	His Leu Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Gln			
25		245	250	

<210> 2

<211> 753

3 / 7

<212> DNA

<213> Devosia riboflavina

<400> 2

5 atg tcc cag gat ttt tca ggc aag gtc gca ttc gta acg ggt ggt gcc 48
Met Ser Gln Asp Phe Ser Gly Lys Val Ala Phe Val Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

tcg ggc atc ggt gag gcg gtc gtc aag cag ctt gcc gcg cgc ggc gcc 96
10 Ser Gly Ile Gly Glu Ala Val Val Lys Gln Leu Ala Ala Arg Gly Ala
20 25 30

aag gtt gtg gtt gcc gat ctc aag ctc gaa ggc gcg cag gcg gtt gcc 144
Lys Val Val Val Ala Asp Leu Lys Leu Glu Gly Ala Gln Ala Val Ala
15 35 40 45

gat gcg gtc aag gcc gcc ggc ggc gaa gcg gcc gcg gta gct gtc gat 192
Asp Ala Val Lys Ala Ala Gly Gly Glu Ala Ala Ala Val Ala Val Asp
50 55 60

20 gtc gcc aag gcc gat cag gtg gag aag gct gtc cag ttc gcc gtc gac 240
Val Ala Lys Ala Asp Gln Val Glu Lys Ala Val Gln Phe Ala Val Asp
65 70 75 80

25 acc ttt ggc gcc ctg cat ctg gcg gtc aat aat gcc ggc att ggc ggc 288
Thr Phe Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

gct tcc gct ccc ctc ggc gat tat tcc ttc gac gac tgg cat agg gtt 336

4 / 7

Ala Ser Ala Pro Leu Gly Asp Tyr Ser Phe Asp Asp Trp His Arg Val

100

105

110

atc gac gtc aat ctc aat tcc gtc ttc tat tcg atg aag tac gag atc 384

5 Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Phe Tyr Ser Met Lys Tyr Glu Ile

115

120

125

gtc gcc atg ctc agg gca ggc ggt ggc gcc atc gtc aac atg gcc tcc 432

Val Ala Met Leu Arg Ala Gly Gly Gly Ala Ile Val Asn Met Ala Ser

10

130

135

140

atc ctc ggc tcg gtg acc ttt ccc aat gca ccg gcc tat gtc acc gcc 480

Ile Leu Gly Ser Val Thr Phe Pro Asn Ala Pro Ala Tyr Val Thr Ala

145

150

155

160

15

aag cac ggc gtg gtc ggc atg acc aag tcg gcc gcg gtg gac tat gcc 528

Lys His Gly Val Val Gly Met Thr Lys Ser Ala Ala Val Asp Tyr Ala

165

170

175

20 aaa aag ggc att cgc gtc acg gcc gtc ggg ccc ggt ttc atc gac acg 576

Lys Lys Gly Ile Arg Val Thr Ala Val Gly Pro Gly Phe Ile Asp Thr

180

185

190

ccg ctc cta tcc gcc ttg ccc aag gaa acc ctg gac tac ctc aaa tcc 624

25 Pro Leu Leu Ser Ala Leu Pro Lys Glu Thr Leu Asp Tyr Leu Lys Ser

195

200

205

gtc cat ccg atc gga cgg ctg ggt acc tcg gat gaa gtc gca gcg ctg 672

Val His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ser Asp Glu Val Ala Ala Leu

5 / 7

210

215

220

acc gcg ttc ctg ctc tcc gat gca gcg tcg aac atc acc ggc tcc tat 720

Thr Ala Phe Leu Leu Ser Asp Ala Ala Ser Asn Ile Thr Gly Ser Tyr

5 225

230

235

240

cac ctg gtc gat ggc ggc tac gtc gcc caa tag

753

His Leu Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Gln

245

250

10

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer1

20 <400> 3

atgcargayt tytcnggnaa

20

<210> 4

25 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

6 / 7

<223> Description of Artificial Sequence:primer2

<400> 4

gtdatrttrc tngcngcrtc

20

5

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer3

15 <400> 5

gagtcatatg tcccaggatt ttccaggca

29

<210> 6

20 <211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

25 <223> Description of Artificial Sequence:primer4

<400> 6

ggcagaattc ctattgggcg acgtagccg

29

7 / 7

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

5 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer5

10 <400> 7

gccgaattct aaggaggta acaatgtata aa

32

<210> 8

15 <211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> Description of Artificial Sequence:primer6

<400> 8

goggtoact tatccgogtc ctgcttgg

28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11957

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/04, 15/53, 1/21, C12P7/04, 17/10, 41/00// (C12N1/21, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/04, 15/53, 1/21, C12P7/04, 17/10, 41/00, C12N1/21, C12R1:19

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Swiss Prot/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 8-89261 A (Kaneka Corp.), 09 April, 1996 (09.04.96), Full text (Family: none)	1-4/5-23
P, X	WO 03/31636 A1 (Kaneka Corp.), 17 April, 2003 (17.04.03), Full text (Family: none)	1-4/5-23
A	EP 654534 A2 (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 24 May, 1995 (24.05.95), Full text & JP 8-98697 A & US 5629200 A & US 5811293 A & US 6114582 A & US 2003/0143701 A1	1-23

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
10 December, 2003 (10.12.03)

Date of mailing of the international search report
24 December, 2003 (24.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int C17 C12N9/04, 15/53, 1/21, C12P7/04, 17/10, 41/00 //(C12N1/21, C12R1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int C17 C12N9/04, 15/53, 1/21, C12P7/04, 17/10, 41/00, C12N1/21, C12R1:19

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI(DIALOG), CA(STN), REGISTRY(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	JP 8-89261 A(鐘淵化学工業株式会社) 1996. 04. 09 全文(ファミリーなし)	1-4/5-23
PX	WO 03/31636 A1(鐘淵化学工業株式会社) 2003. 04. 17 全文(ファミリーなし)	1-4/5-23
A	EP 654534 A2(DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 1995. 05. 24 全文 & JP 8-98697 A & US 5629200 A & US 5811293 A & US 6114582 A & US 2003/0143701 A1	1-23

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 12. 03

国際調査報告の発送日 24.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4B

3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3448